

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
1. Februar 2001 (01.02.2001)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 01/07648 A1

- (51) Internationale Patentklassifikation⁷: C12Q 1/68 (74) Anwälte: WEBER-QUITZAU, Martin usw.; Uexküll & Stolberg, Beselerstrasse 4, D-22607 Hamburg (DE).
- (21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP99/05234 (81) Bestimmungsstaaten (*national*): AE, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CU, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.
- (22) Internationales Anmeldedatum:
22. Juli 1999 (22.07.1999)
- (25) Einreichungssprache: Deutsch
- (26) Veröffentlichungssprache: Deutsch
- (71) Anmelder (*für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von US*): ARTUS GESELLSCHAFT FÜR MOLEKULARBIOLOGISCHE DIAGNOSTIK UND ENTWICKLUNG MBH [DE/DE]; Gerstäckerstrasse 9, D-20459 Hamburg (DE).
- (72) Erfinder; und (84) Bestimmungsstaaten (*regional*): ARIPO-Patent (GH, GM, KE, LS, MW, SD, SL, SZ, UG, ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI-Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- (75) Erfinder/Anmelder (*nur für US*): KRUPP, Guido [DE/DE]; Wannseebogen 30A, D-24111 Kiel (DE). SCHEINERT, Peter [DE/DE]; Övelgönnner Strasse 25, D-20257 Hamburg (DE). SÖLLER, Rainer [DE/DE]; Lesmonastrasse 18, D-28717 Bremen (DE). SPENGLER, Ulrich [DE/DE]; Bahrenfelder Kirchenweg 25, D-22761 Hamburg (DE).
- Veröffentlicht:
— Mit internationalem Recherchenbericht.
- Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes, und der anderen Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe der PCT-Gazette verwiesen.



BEST AVAILABLE COPY

WO 01/07648 A1

(54) Title: METHOD FOR THE SPECIES-SPECIFIC DETECTION OF ORGANISMS

(54) Bezeichnung: VERFAHREN ZUM SPEZIESSPEZIFISCHEN NACHWEIS VON ORGANISMEN

(57) Abstract: The invention relates to a method for the species-specific detection of prokaryotes and eucaryotes, and to kits for implementing said method. The invention also relates to a method for species-specific detection of sepsis inducers.

(57) Zusammenfassung: Die vorliegende Erfindung betrifft Verfahren zum speziesspezifischen Nachweis von Prokaryonten und Eukaryonten sowie Kits zur Durchführung dieser Verfahren. Insbesondere betrifft die Erfindung ein Verfahren zum speziesspezifischen Nachweis von Sepsiserregern.

Verfahren zum speziesspezifischen Nachweis von Organismen

Die vorliegende Erfindung betrifft Verfahren zum speziesspezifischen Nachweis von Prokaryonten und Eukaryonten sowie Kits zur Durchführung dieser Verfahren. Insbesondere betrifft die Erfindung ein Verfahren zum speziesspezifischen Nachweis von Sepsiserregern.

Der zuverlässige Nachweis verschiedenster Organismen, insbesondere von Mikroorganismen wie Bakterien, spielt eine zunehmende Rolle in der medizinischen Mikrobiologie und ist häufig Voraussetzung für die gezielte Behandlung von Infektionen bei Mensch und Tier. In diesem Zusammenhang haben Gürtler et al. (Microbiology 142 (1996) 3-16) und Scheinert et al., J. Microbiol. Methods 26 (1996) 103-117) die Verwendung der 16S-23S rDNA bzw. rRNA Spacer-Region zur Typisierung und Identifikation von Bakterien vorgeschlagen. Die Sequenzen von rRNAs werden bislang am häufigsten zur Identifikation von Mikroorganismen benutzt. Im Genom von prokaryontischen und eukaryontischen Organismen sind die Operons für ribosomale RNAs (rRNAs) so organisiert, daß

BESTÄTIGUNGSKOPIE

zunächst eine umfassende Vorläufer-rRNA transkribiert wird. Diese Vorläufer-rRNAs enthalten im wesentlichen folgende Komponenten in 5'-3'-Richtung:

5 Prokaryonten - ribosomale DNA umfaßt Sequenzen für:

5' - 16S rRNA - transkribierter 16S/23S rRNA-Spacer - 23S rRNA - transkribierter 23S/5S rRNA-Spacer - 5S rRNA - 3'

10 Eukaryonten - ribosomale DNA umfaßt Sequenzen für:

5' - 18S rRNA - transkribierter 18S/5.8S rRNA-Spacer (ITS1) - 5.8S rRNA - transkribierter 5.8S/28S rRNA-Spacer (ITS2) - 28S rRNA - 3'.

15

Diese generelle Organisation ist bei allen Prokaryonten (*Bacteria* und *Archaea*) und Eukaryonten vorhanden (vgl. z.B. B. Lewin, Genes V, Cell Press, Cambridge, Massachusetts/USA, 1994), wobei bislang nur sehr wenige Ausnahmen, wie z.B. das *Archaeon Thermoplasma acidophilum* (Achenbach-Richter et al., System. Appl. Microbiol. 10 (1988) 211-214) oder *Helicobacter* (Tomb et al., Nature 388 (1997) 539-547) bekannt sind.

25 Es hat sich herausgestellt, daß die Längen der rRNA-Spacer extrem variabel sind und innerhalb einer gut definierten Gruppe von Mikroorganismen, wie z.B. Mycoplasmen, allein die Länge ein geeignetes Mittel zur Einordnung von Mikroorganismen in diese Gruppe (z.B. Mycoplasmen) ist und zum Teil auch zur Identifizierung einzelner Spezies innerhalb dieser Gruppe herangezogen
30 werden kann.

Bei den von Gürtler et al. (a.a.O.) und Scheinert et al. (a.a.O.) beschriebenen Verfahren zur Typisierung und Identifizierung von Bakterien unter Verwendung der 16S-23S rDNA bzw.
35 rRNA Spacer-Region wird unter Verwendung geeigneter Primer zunächst eine Amplifikation durch Polymerase-Kettenreaktion (PCR-

Amplifikation) durchgeführt. Die amplifizierten Spacer können anschließend gelelektrophoretisch aufgetrennt und durch geeignete Detektionsverfahren, wie z.B. Färbung mit Ethidiumbromid oder Silber oder durch Fluoreszenzdetektion, nachgewiesen werden. Die
5 Lage der Banden, d.h. die Länge der amplifizierten Spacer, erlaubt einen vorläufigen Rückschluß auf den jeweils nachgewiesenen Mikroorganismus bzw. die jeweilige Mikroorganismen-Gruppe.

Für einen sicheren Nachweis, insbesondere zur Erkennung einzel-
10 ner Spezies, ist in der Regel eine sekundäre Längenunterscheidung nach definierter restriktionsenzymatischer Behandlung der amplifizierten Spacer erforderlich. Die einzelnen Spezies innerhalb einer Mikroorganismen-Gruppe ergeben nach gelelektrophoretischer Auftrennung und Hybridisierung mit Spezies-spezifischen
15 Oligonukleotidsonden ein charakteristisches Bandenmuster.

Diese Methoden weisen den Nachteil auf, daß zum Spezies-spezifischen Erreger-Nachweis eine genaue Kenntnis über die jeweils zu erwartenden Bandenmuster erforderlich ist und darüber hinaus
20 eine extrem große Zahl spezifischer Oligonukleotidsonden zur Verfügung stehen muß. Die bislang im Stand der Technik bekannten Methoden eignen sich daher nicht zum routinemäßigen Erreger-Nachweis in medizinischen Labors.

25 Im Hinblick auf die Sepsis, eine schwere, akut verlaufende Infektionserkrankung, die durch bestimmte Bakterien hervorgerufen wird, die in den Blutkreislauf gelangt sind, stellt sich ferner das zusätzliche Problem, daß diese Bakterien von einem lokal entzündlichen Herd ausgehen und über den Blut- oder Lymphweg in
30 Schüben ausgestreut werden. Aufgrund dieser zyklischen Schwankung sind zum bakteriellen Nachweis bei Sepsis relativ große Mengen Blut erforderlich (jeweils ca. 5 bis 10 ml für aerobe und anaerobe Blutkultur). Dieses große Probenvolumen ist mit den derzeit zur Verfügung stehenden Mitteln und Methoden nur mit
35 großem Aufwand handhabbar, da größere Kontaminationen mit Fremd-DNA (d.h. nicht-bakterieller DNA) zu einer unspezifischen Auf-

reinigung und damit zur Verringerung der Spezifität einer nachfolgenden PCR führt. Die große Zahl roter Blutkörperchen kann ferner inhibitorisch auf die PCR wirken, und größere Probenvolumina sind für kommerziell erhältliche Kits in der Regel nicht geeignet, da es häufig zur Verstopfung der zur Aufreinigung verwendeten Säulen kommt.

Aufgabe der vorliegenden Erfindung ist es daher, ein Verfahren zum Nachweis von Organismen (Prokaryonten und Eukaryonten), z.B. in ausgewählten biologischen Proben, zur Verfügung zu stellen, das einfach handhabbar ist und sich für den routinemäßigen Einsatz in medizinischen Labors eignet. Das Verfahren soll ferner eine hohe Spezifität gegenüber einer sehr großen Zahl von Erreger-Gruppen aufweisen, wobei eine Unterscheidung einzelner Spezies innerhalb dieser Gruppen auf einfache, experimentell unaufwendige und kostengünstige Weise möglich sein soll. Schließlich ist es Aufgabe der Erfindung, ein einfaches Verfahren zur Verfügung zu stellen, das den Nachweis von nur in geringen Konzentrationen vorliegenden Mikroorganismen ermöglicht, wie es z.B. zeitweise im zyklischen Verlauf der Sepsis der Fall ist.

Die Aufgabe wird erfindungsgemäß durch Verfahren nach den Ansprüchen 1 bis 17 und 19 bis 24 und Kits nach den Ansprüchen 25 bis 40 gelöst.

25

Die Erfindung betrifft somit ein Verfahren zum spezies-spezifischen Nachweis von Prokaryonten oder Eukaryonten mit Hilfe von Nukleinsäure-Amplifikationstechniken, bei dem man zunächst gegebenenfalls eine Anreicherung, Aufkonzentrierung und/oder Vermehrung der nachzuweisenden Prokaryonten oder Eukaryonten in einer biologischen Probe vornimmt und/oder die in der biologischen Probe vorhandene DNA isoliert und/oder anreichert. Die Amplifikation der DNA erfolgt mit Hilfe einer Nukleinsäure-Amplifikationstechnik (NAT), bei der man unter Verwendung von Amplifikationsprimern, die die für die betreffenden Organismen konservierten Sequenzen enthalten, einen Bereich der DNA ampli-

fiziert, der durch die konservierten Sequenzen flankiert ist.

Zur Durchführung des erfindungsgemäßen Verfahrens können beliebige, dem Fachmann geläufige Nukleinsäure-Amplifikationstechniken (NAT) eingesetzt werden, vorzugsweise eine NAT aus der Gruppe bestehend aus PCR, bDNA, LCR, 3SR, SDA oder NASBA.

Zu den (isolierten) Amplifikaten wird im nächsten Schritt ein Sequenzierprimer zugegeben, der mit einem Bereich innerhalb der amplifizierten Sequenzen hybridisiert, der bei den nachzuweisenden Prokaryonten oder Eukaryonten konserviert ist. Der Sequenzierprimer dieser als "Minisequencing" bezeichneten Verfahrensstufe wird dabei so gewählt, daß für die nachzuweisenden Prokaryonten oder Eukaryonten jeweils unterschiedliche Elongate erhalten werden, wenn man eine Kettenabbruchpolymerisation durchführt, bei der man 1, 2, oder 3 der vier möglichen Desoxyribonukleosidtriphosphate (dNTPs) verwendet oder von den vier möglichen dNTPs eines durch ein Kettenabbruch-Desoxyribonukleosidtriphosphat (Kettenabbruch-NTP) ersetzt. Nach Bestimmung des jeweils erhaltenen Längenzuwachses (Elongate; d.h. Anzahl der Basen, um die die Amplifikate verlängert wurden), den die Produkte der Kettenabbruchpolymerisation gegenüber den Amplifikaten aufweisen, werden diese Werte mit den Elongaten verglichen, die für die jeweiligen Organismen aufgrund ihrer Sequenz zu erwarten sind. Ein bestimmter, in der Probe vorhandener Prokaryot oder Eukaryot wird dadurch nachgewiesen, daß beobachtete (erzielte) Elongation und erwartete Elongation übereinstimmen.

Im Einzelfall kann es vorkommen, daß mehrere der in der Probe vorhandenen Organismen bei Verwendung eines einzigen Sequenzierprimers gleiche Elongate (d.h. denselben Längenzuwachs im Vergleich zu den Amplifikaten) ergeben. Gegebenenfalls verwendet man dann einen oder mehrere weitere Sequenzierprimer, der/die mit einem Bereich/Bereichen innerhalb der amplifizierten Sequenzen hybridisiert/hybridisieren, der/die bei den nachzuweisenden Prokaryonten oder Eukaryonten konserviert ist/konserviert sind,

wobei der/die weitere/weiteren Sequenzierprimer so gewählt ist/-
sind, daß für die nachzuweisenden Prokaryonten oder Eukaryonten
jeweils unterschiedliche Elongate erhalten werden, wenn man eine
Kettenabbruchpolymerisation durchführt, bei der man 1, 2, oder
5 3 der vier möglichen dNTPs verwendet oder von den vier möglichen
dNTPS eines durch ein Kettenabbruch-NTP ersetzt. Nach Bestimmung
des für jeden Sequenzierprimer jeweils erhaltenen Längenzuwach-
ses (Elongate; Anzahl der Basen, um die die Amplifikate verlän-
gert wurden), den die Produkte der Kettenabbruchpolymerisation
10 gegenüber den Amplifikaten aufweisen, werden diese Werte mit den
Elongaten verglichen, die für die jeweiligen Organismen aufgrund
ihrer Sequenz zu erwarten sind. Ein in der Probe vorhandener
Prokaryot oder Eukaryot wird dadurch nachgewiesen, daß die bei
Einsatz der verschiedenen Sequenzierprimer experimentell erhal-
15 tenen Elongationswerte (experimentell bestimmtes Elongations-
muster) mit den für diesen Organismus zu erwartende Elongations-
werten (erwartetes Elongationsmuster) übereinstimmen.

Zum speziesspezifischen Nachweis von Organismen in biologischen
20 Proben müssen somit genau soviele verschiedene Sequenzierprimer
verwendet werden, bis für alle, möglicherweise in der Probe
vorhandenen Organismen unterschiedliche Elongationsmuster erhal-
ten werden. Im Beispielteil ist dies anhand der Bestimmung von
Sepsiserregern veranschaulicht.

25 Die bei der Kettenabbruchpolymerisation verwendeten Sequenzier-
primer haben vorzugsweise eine Länge von 15 bis 30 Nukleotiden.
Als Kettenabbruch-NTPs (chain terminators) kommen z.B. Didesoxy-
ribonukleosidtriphosphate (ddNTPs), 3'-O-Methyl-NTPs, 3'-Amino-
30 NTPs und dergleichen in Frage.

Gemäß einer besonderen Ausführungsform der Erfindung kann das
Verfahren bei Verwendung mehrerer Sequenzierprimer durchgeführt
werden, indem man bei der Kettenabbruchreaktion von den vier
35 möglichen dNTPs eines durch ein Kettenabbruch-NTP (z.B. ddA) er-
setzt, wobei die Polymerisation in gleichzeitiger Gegenwart

aller Sequenzierprimer erfolgt, wobei die Sequenzierprimer jeweils unterschiedliche Markierungen tragen, um die Unterscheidbarkeit der jeweiligen Elongate zu ermöglichen.

- 5 Die Länge der Elongate kann durch dem Fachmann bekannte Methoden bestimmt werden, wie z.B. mit Hilfe elektrophoretischer Methoden, durch massenspektrometrischen Nachweis oder z.B. durch Fluoreszenzkorrelationsspektroskopie (FCS) oder vergleichbare Methoden. In diesem Zusammenhang ist es von Vorteil, vorzugs-
- 10 weise den Sequenzierungsprimer zu markieren. Bei Einsatz mehrerer Sequenzierungsprimer sollten diese, insbesondere bei Durchführung der Polymerisationen in einem einzigen Reaktionsgefäß unter Verwendung von nur einem Terminator (z.B. ddA), unterschiedlich markiert sein. Geeignete Markierungen, wie z.B. Fluoreszenzlabel oder sich in ihrer Masse unterscheidende Markierungen,
- 15 sind dem Fachmann wohlbekannt.

Gemäß einer besonders bevorzugten Ausführungsform der Erfindung weist man die Primerelongate massenspektroskopisch nach, wobei

20 sich MALDI-TOF-Spektrometrie (Matrix-assisted laser desorption ionization time of flight spectrometry (MALDI-TOF-Spektrometrie), vgl. z.B. Fu et al., Nature Biotechnol. 16 (1998) 381-384)) als besonders vorteilhaft erwiesen hat, die einen Nachweis von bis zu 2000 Nukleotiden oder mehr gestattet.

25

Vorteilhaft ist in diesem Zusammenhang die "Multiplex-Analyse", d.h. die simultane Analyse der Elongationsprodukte mehrerer Sequenzierungsprimer mit unterschiedlichen Zielsequenzen. Dazu werden die Elongationsreaktionen mit unterschiedlich markierten

30 Sequenzierungsprimern entweder in einem Reaktionsgefäß unter Verwendung eines einzigen Terminators (Alternative A) oder in verschiedenen Reaktionsgefäßen unter Verwendung unterschiedlicher Terminatoren (Alternative B) durchgeführt, wobei in Alternative B die Produkte der (parallelen) Elongationsreaktionen für

35 die Analyse vereinigt werden. Die notwendige Unterscheidung der Elongationsprodukte ist möglich durch Markierung der Oligonu-

kleotide mit:

(a) unterschiedlich langen 5'-terminalen Zusatzsequenzen, "Tails" (einsetzbar bei allen Nachweisverfahren),

5

(b) unterschiedlichen 5'-terminale Additionen, die Laufverhalten (bei Standard-Polyacrylamid-Gelelektrophorese oder hochauflösender Gelelektrophorese wie Plattengel-, Kapillar- oder Array-Kapillar-Gelelektrophorese) oder Molekulargewicht (MALDI-TOF) drastisch verändern. Beispiele für solche Additionen sind Polyethylenglykol-Kette, Cholesterin-Derivate etc.,

10

(c) unterschiedlichen Fluoreszenzfarbstoffen (bei Standard-Polyacrylamid-Gelelektrophorese, kombiniert mit einem Fluoreszenz-Scanner; routinemäßig bei hochauflösender Gelelektrophorese; prinzipiell auch möglich bei massenspektroskopischer Analyse, wobei durch charakteristische Molekulargewichtswerte und das extrem hohe Auflösungsvermögen auch sich überlagernde Elongationsmuster differenziert werden können).

15

20

Das erfindungsgemäße Verfahren unterliegt prinzipiell keinen methodischen Einschränkungen auf eine bestimmte Organismengruppe. Voraussetzung für die sichere (Wieder-)Erkennung und Organismendifferenzierung ist lediglich, daß die Zielsequenzen (z.B. rRNA, rDNA) der nachzuweisenden Organismen bekannt ist. Das erfindungsgemäße Verfahren der Organismenbestimmung anhand universeller, d.h. in allen Organismen essentiell vorkommenden Sequenzen, (wie z.B. ribosomalen Sequenzen) ist daher zum differenziellen Nachweis definierter Organismengruppen aller Arten von Prokaryonten und Eukaryonten (Bakterien, Pilzen, Pflanzen und Tiere) geeignet.

35

Im Rahmen der vorliegenden Erfindung werden unter "Prokaryonten"

Vertreter der Gruppe der *Bacteria* und *Archaeae* verstanden und schließen sämtliche, unter diese Gruppen fallenden Spezies mit ein. Der Begriff "Eukaryonten" schließt sowohl ein- als auch mehrzellige Organismen ein, wie z.B. Amöben, Trypanosomen, Plasmodien, Hefen, ein- und mehrzellige Parasiten, sowie Pflanzen und Tiere, wobei sämtliche, unter diese Gruppen fallenden Spezies eingeschlossen sind.

Als Zielsequenzen können im Rahmen der vorliegenden Erfindung im Prinzip alle durch konservierte Bereiche flankierte variable Sequenzen in Betracht kommen, die in allen (nachzuweisenden) Organismen essentiell vorkommen. Beispielsweise ist es möglich, die variablen rDNA-Sequenzen einschließlich rRNA-Spacer als Zielsequenzen auszunutzen. Darüber hinaus kann aber auch von anderen speziesspezifischen Genen oder Genabschnitten ausgegangen werden, wie z.B. vom Cytochrom b-Gen aus Mitochondrien (vgl. Irwin et al., J. Mol. Evol. 32 (1991) 128-144), das zum spezies-spezifischen Nachweis von Eukaryonten dienen kann.

Das erfindungsgemäße Verfahren kann in den unterschiedlichsten Bereichen angewandt werden. Die in den nachfolgenden Anwendungsbeispielen genannten (Mikro-)Organismen stehen jedoch nur stellvertretend für andere Vertreter aus den jeweiligen Organismenreichen (Prokaryota = Bakterien; Eukaryota = ein- und vielzellige Pilze, Pflanzen und Tiere) wie sie in der biologischen Systematik unterschieden werden:

- a) Nachweis von Sepsis-Erregern sowie anderen bakterielle Erregern (Pathogenen) bei Mensch, Tier und Pflanzen sowie in Zellkulturen derselben;
- b) Nachweis von Einzellern (Protozoen: Flagellaten, Amöben, Sporozoa, Ciliaten) als Verursacher von z.B. Darmerkrankungen bei Mensch und Tier (insbesondere auch Nutztieren);
- c) Nachweis von Schädlingen, Kontaminanten, Verderbnis-Erregern

und Pathogenen in der Landwirtschaft, Tierzucht, Lebensmittelindustrie sowie beim Saatgut: hier sind wiederum definierte Organismengruppen aus allen systematischen Gruppen des Lebens (s.o.) differenzierbar und ausdrücklich eingeschlossen, insbesondere aus den Gruppen der Bakterien, Protozoen, Pilze und Artrophoden;

d) Nachweis von Helminthen (Würmer) als Verursacher von Darm-
erkrankungen (z.B. Durchfall);

e) Nachweis von Pilzen als Erreger von Pilzerkrankungen bei
Mensch, Tier und Pflanze;

f) Art-, Rassen- und Herkunftsbestimmung in der Tier- und
Pflanzenzucht, Arterhaltungszucht sowie Landwirtschaft,
Fischerei (z.B. Stichproben bei Überprüfung der Fangquoten)
und bei Lebensmittelkontrollen;

g) Biodiversitäts-Untersuchungen für definierte Gruppen von
Organismen wie z.B. von Süß- oder Salzwasserfischen ein-
schließlich deren Larvenstadien in Europa oder anderen geo-
graphisch eingrenzbaeren Regionen (z.B. zur Bestimmung von
Bestandszahlen für Fangquoten u.a.), Bestimmung von Leit-
organismen für Gewässergüte oder Bodenbegutachtung.

Insbesondere in der medizinischen Diagnostik kann das Verfahren
der vorliegenden Erfindung universell eingesetzt werden, wie
z.B. zur Klärung der Frage, welche Erreger(gruppen) vorliegen,
wenn ein bestimmtes Krankheitssymptom beobachtet wird. So können
beispielsweise die Ursachen für die folgenden medizinisch
relevanten Krankheitssymptome mit Hilfe des erfindungsgemäßen
Verfahrens ermittelt werden:

- Fieber als Folge von bakteriellen (Sepsis), parasitären
(z.B. Malaria) oder Pilz-Erregern (z.B. Candida) im Blut;

- 5 - Hirn- oder Hirnhautentzündung, d.h. Kopfschmerzen, Nackensteifigkeit, Bewußtseinstörung aufgrund von bakteriellen (Meningokokken, Haemophilus influenza, Pneumokokken, Tuberkelbacillen, E. coli, Listeria monocytogenes), parasitären (z.B. Toxoplasmosis) oder Pilz-Infektionen (z.B. Cryptococcus neoformans);
- 10 - Infektionen des Respirationstrakts, d.h. Husten, Auswurf, Kurzatmigkeit etc. aufgrund von bakteriellen (z.B. Pneumokokken, Chlamydien, Mycoplasmen), parasitären oder Pilz-Infektionen (z.B. Pneumocystis carinii);
- 15 - Infektionen des Auges, d.h. tränendes Auge, unter Umständen Eiter, getrübbtes Sehen etc. Als mögliche Ursache können wiederum eine Reihe von bakteriellen (z.B. Chlamydien, Gonorrhoe, Staphylococcus aureus) oder parasitären Erregern (z.B. Toxoplasma gondii, Onchocerca volvulus etc.) in Betracht kommen;
- 20 - Durchfall und Gewichtsverlust etc. als Folge von bakteriellen (z.B. Salmonellen, Yersinien, Campylobacter, E.coli, Vibrionen, Clostridien, Bacillus), parasitären (z.B. Amöben, Giardien, Cryptosporidien) oder Pilzinfektionen (Candida);
- 25 - Schmerzen bei der Miktion, Hämaturie etc. als Zeichen einer Harnwegsinfektion, z.B. verursacht durch E.coli, Staphylokokken, weitere Enterobacteriaceen wie Proteus mirabilis als bakterielle Erreger, Candida als Pilzvertreter, oder Schistosomen als parasitäre Erreger. Zu dieser Gruppe zählen
- 30 auch die primär sexuell übertragbaren Erreger, wie z.B. Chlamydien, Gonorrhoe, Syphilis, Mycoplasmen etc.;
- 35 - Infektionen der Haut, d.h. Hautrötungen, Hautjucken, Bläschenbildung etc. Zurückzuführen auf Pilzinfektionen mit Dermatophyten wie z.B. Trichophyton, Epidermophyton und Microsporon, bakterielle Infektionen (z.B. Staphylococcus

aureus oder Steptococcus pyogenes) oder parasitäre Erkrankungen, z.B. Leishmanien.

Durch Anwendung des erfindungsgemäßen Verfahrens können Erreger
5 speziesspezifisch nachgewiesen werden, wodurch gezieltere und
damit häufig nebenwirkungsärmere Behandlungen ermöglicht werden
als im Falle breiter angelegter Therapien.

10 Unter "biologischen Proben" werden im Rahmen der vorliegenden
Erfindung alle Arten von Proben verstanden, in denen eine be-
grenzte, wohldefinierte Gruppe nachzuweisender Prokaryonten oder
Eukaryonten vorliegen kann. Bei Anwendung des erfindungsgemäßen
Verfahrens in der medizinischen Diagnostik kann es sich bei der
15 biologischen Probe z.B. um Blut, Stuhl, Abstriche etc. handeln
(z.B. Nachweis von Sepsiserregern in Blut, Nachweis von Protozo-
en in Blut oder Faeces etc.). Beim Nachweis von Lebensmittelkon-
taminanten, Pflanzenschädlingen und dergleichen können allgemein
tierische oder pflanzliche Gewebe oder Flüssigkeiten, wie z.B.
20 Fleisch oder Fleischsaft, als Probe dienen (z.B. Nachweis von
Salmonellen in Fleisch, Nachweis von Pflanzenschädlingen in
Saatgut). Ferner kommen Umweltproben wie z.B. Boden- oder Gewäs-
serproben in Betracht. Bei Fischbestandsanalysen oder z.B. zur
Artenbestimmung in der Fischzucht und Fischeribiologie kann als
25 biologische Probe etwa auch Fischlaich oder eine Planktonprobe
dienen.

Der Fachmann ist in der Lage, die biologischen Proben zum spe-
ziesspezifischen Nachweis von Organismen so auszuwählen, daß die
30 Gruppe der Organismen, die in der Probe vorliegen können, be-
grenzt und wohldefiniert ist. So sind z.B. bei der Abklärung
einer Sepsis die für diese Erkrankung verantwortlichen Erreger
bekannt, so daß bei der Untersuchung einer Blutprobe der klini-
sche Verdacht auf Sepsis bestätigt werden kann, wenn man durch
35 Anwendung des erfindungsgemäßen Verfahrens eines oder mehrere
der in Tab. 1 aufgelisteten Bakterien nachweist.

Gemäß einer besonderen Ausführungsform der Erfindung wird somit ein Verfahren zum Nachweis von Sepsiserregern zur Verfügung gestellt, bei dem die biologische Probe Blut ist und die Organismen aus der Gruppe bestehend aus *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus pyogenes*, *Enterococcus faecalis*, *Neisseria meningitidis*, *Escherichia coli*, *Enterobacter spec.*, *Proteus spec.*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas mendocina*, *Pseudomonas syringae*, *Haemophilus influenzae*, *Haemophilus ducreyi* und *Bacteroides spec.* ausgewählt sind. Vorzugsweise wird das Verfahren durchgeführt, indem man Blut des Patienten in Puffer aufnimmt und die humanen Zellen einer Lyse unterzieht, z.B. unter Verwendung von 1 bis 20 Gew.-% Tween[®] (Polyoxyethylen-Derivate von Sorbitanestern), Triton[®] oder 3-[N-(3-Cholanamidopropyl)-dimethylammonio]-1-propansulfonat (CHAPS). Besonders bevorzugt wird das Blut in Lysispuffer durch Vermischen von 1 Volumenanteil Blut mit 4 Volumenanteilen Lysispuffer aufgenommen, wobei der Lysispuffer aus 109,5 g (0,32 M) Sucrose, 1,221 g (10 mM) Tris-HCl, 10 ml (1%) Triton X-100, 1,016 g (5 mM) MgCl₂ ad 1000 ml destilliertem Wasser (pH 7,5) besteht, man anschließend für 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend das Gemisch in einem Zentrifugenröhrchen einer geeigneten Menge einer Kissenflüssigkeit einer Dichte von 1,07 g/ml überschichtet und man bei 1500 g für 30 Minuten bei Raumtemperatur zentrifugiert, wodurch man die Bakterien im Pellet erhält (anreichert). Gemäß einer bevorzugten Ausführungsform der Erfindung verwendet man eine Kissenflüssigkeit, von der 100 ml aus 10 ml (1,5 M) NaCl-Lösung (87,6 g NaCl auf 1000 ml), 49,2 ml Percoll mit einer Dichte von 1,13 ± 0,005 g/ml und 40,8 ml destilliertem Wasser bestehen.

Das Pellet wird vorzugsweise anschließend zweimal mit 0,15 M NaCl-Lösung bei Raumtemperatur gewaschen, bei 1500 g pelletiert, und man verdaut das in TE-Puffer (10 mM Tris-HCl (pH 8), 1 mM Na₂EDTA) resuspendierte Bakterienpellet nachfolgend für 2 Stunden bei 56°C mit Proteinase K, und man inaktiviert die Proteinase K

im Anschluß bei 95°C für 15 Minuten, wobei man das erhaltene Lysat, das die bakterielle DNA enthält, entweder unmittelbar in einer Nukleinsäure-Amplifikationstechnik einsetzt oder man zuvor eine weitere Aufreinigung durch Verwendung eines z.B. auf Glas-
5 matrix (Glasmilch) basierenden Aufreinigungssystems zum Aufschluß von Bakterien und/oder zur Elimination von Inhibitoren der Amplifikation durchführt.

Bei der Kissenflüssigkeit kann anstelle von Percoll auch Sucrose
10 oder Ficoll eingesetzt werden. Die Dichte des Kissens sollte in jedem Fall bei 1,07 g/ml liegen.

Anschließend wird - wie oben angegeben - eine dem Fachmann allgemein bekannte NAT mit anschließender Kettenabbruchpolymerisation
15 durchgeführt.

Gemäß einer bevorzugten Ausführungsform der Erfindung verwendet man als Amplifikationsprimer beim Nachweis von Sepsiserregern das Primerpaar gemäß SEQ ID NO 1 und 2 oder das Primerpaar gemäß
20 SEQ ID NO 3 und 4 aus, wobei das Primerpaar gemäß SEQ ID NO 1 und 2 besonders bevorzugt ist. Für die Kettenabbruchpolymerisation verwendet man vorzugsweise mindestens einen Sequenzierungsprimer aus der Gruppe bestehend aus SEQ ID NO 5, 6, 7, 8, 9, 10 und 11 (vgl. auch D.J. Lane in "Nucleic Acid Techniques in Bacterial Systematics", John Wiley & Sons 1991, S. 115-175). Besonders bevorzugt führt man drei Kettenabbruchpolymerisationen durch, eine Reaktion in Gegenwart der Sequenzierungsprimer gemäß
25 SEQ ID NO 5 und 6 (vorzugsweise mit ddA als Terminator), eine Reaktion mit den Primern gemäß SEQ ID NO 7, 8, und 9 (vorzugsweise mit ddG als Terminator), sowie eine Reaktion in Gegenwart der Primer gemäß SEQ ID NO 10 und 11 (vorzugsweise mit ddA als Terminator).

Als Vorteile des Verfahrens der vorliegenden Erfindung gegenüber
35 der Längenbestimmung von PCR-Fragmenten in einem Agarosegel mit und ohne enzymatischen Restriktionverdau ist insbesondere die

erhöhte Spezifität (Nachweissicherheit) zu nennen. Durch den Einsatz eines internen Primers und dessen Elongation (beim Mini-sequencing, s.o.) ergibt sich eine spezifische Erkennung des PCR-Fragments und damit eine erhöhte Sicherheit im Sinne einer
5 eindeutigen Aussage gegenüber der bloßen Längenbestimmung von PCR-Fragmenten ohne Identitätskontrolle wie z.B. bei Gürtler et al. (vgl. Microbiology 142 (1996) 3-16; WO96/19585).

Für die Durchführung der NAT (z.B. PCR) sowie der Kettenabbruch-
10 polymerisation des erfindungsgemäßen Verfahrens wird etwa die gleiche Zeit benötigt wie für ein herkömmliches Verfahren mit PCR und nachfolgender Enzymbehandlung (vgl. z.B. Gürtler, a.a.O.). Da der Nachweis bzw. die Längenbestimmung der Elongate
15 jedoch automatisierbar ist (z.B. durch Anwendung der MALDI-TOF-Spektrometrie), kann die finale Analyse im Sekunden- bis Minutenbereich durchgeführt werden. Demgegenüber ist eine herkömmliche Gelanalyse naturgemäß nur schwer automatisierbar und damit außerdem kostenintensiver als die erfindungsgemäß bereitgestellte Lösung.

20

Ferner liegt der besondere Vorteil des erfindungsgemäßen Verfahrens darin, daß überraschenderweise ein einfaches und allgemein anwendbares Verfahren zur Verfügung gestellt wird, bei dem ein speziesspezifischer Nachweis von Organismen möglich ist,
25 die - je nach Art der (biologischen) Probe - einer begrenzten, wohldefinierten Gruppe von Prokaryonten oder Eukaryonten angehören.

Das gemäß einem Teilaspekt der vorliegenden Erfindung entwickelte
30 te Verfahren zur Isolierung und/oder Anreicherung bakterieller DNA (einschließlich der Aufbereitung bzw. Aufkonzentrierung von Bakterien) kann auch in anderen Anwendungsbereichen als isoliertes Anreicherungsverfahren - insbesondere von biologischen Proben aus der Gruppe bestehend aus Blut oder Blutprodukten,
35 Fleischsaft, Milch, (Ab-)Wasser oder jeder anderen Flüssigkeit, die mit Bakterien belastet sein kann - verwendet werden. Wie

bereits erwähnt, ist das Verfahren dadurch gekennzeichnet, daß man die biologische Probe gegebenenfalls in Puffer aufnimmt und die nicht-bakterielle Zellen einer Lyse unterzieht, z.B. unter Verwendung von 1 bis 20 Gew.-% Tween[®] (Polyoxyethylen-Derivate von Sorbitanestern), Triton[®] oder 3-[N-(3-Cholanamidopropyl)-dimethylammonio]-1-propansulfonat (CHAPS). Alternativ kann auch der oben genannte bevorzugte Lysispuffer in denselben oder ähnlichen Volumenanteilen verwendet werden. Nach Inkubation für 5 Minuten bei Raumtemperatur wird das Gemisch anschließend in einem Zentrifugenröhrchen einer geeigneten Menge einer Kissenflüssigkeit (s.o.) überschichtet. Bei der weiteren Aufarbeitung einschließlich Proteinase K-Verdau und anschließender Proteinase K-Inaktivierung verfährt man vorzugsweise wie oben am Beispiel der Sepsiserreger angegeben. Das so erhaltene Lysat kann z.B. entweder unmittelbar in einer Nukleinsäure-Amplifikationstechnik eingesetzt werden, gegebenenfalls kann eine weitere Aufreinigung durch Verwendung eines z.B. auf Glasmatrix basierenden Aufreinigungssystems zum Aufschluß von Bakterien und/oder zur Elimination von Inhibitoren der Amplifikation durchgeführt werden.

20

Die Vorteile des erfindungsgemäßen Anreicherungsverfahrens bestehen darin, daß die Abtrennung einer großen, z.B. aus Blutzellen stammenden DNA-Menge ermöglicht wird. Ferner gelingt in vorteilhafter Weise die Entfernung von z.B. aus Blut stammenden Stoffen (Häm etc.), die die Durchführbarkeit von Nukleinsäureamplifikationstechniken hemmen können.

25

Im Rahmen der vorliegenden Erfindung werden ferner Kits zur Durchführung der oben genannten Verfahren zur Verfügung gestellt.

30

Ein Kit zur Durchführung des Verfahrens zur Aufbereitung und/oder Aufkonzentrierung von Bakterien aus biologischen Proben - insbesondere von Blut oder Blutprodukten, Fleischsaft, Milch, (Ab-)Wasser oder jeder anderen Flüssigkeit, die mit Bakterien belastet sein kann - enthält

35

- a) Lysispuffer enthaltend 1 bis 20 Gew.-% Tween[®] (Polyoxy-
ethylen-Derivate von Sorbitanestern), Triton[®] oder 3-
[N-(3-Cholanamidopropyl)-dimethylammonio]-1-propansul-
fonat (CHAPS),
- b) Zentrifugenröhrchen,
- c) Kissenflüssigkeit einer Dichte von 1,07 g/ml, die ver-
wendet wird, um die biologische Probe darüber zu
schichten.

Besonders bevorzugt besteht der Lysispuffer des Kits aus 109,5
g (0,32 M) Sucrose, 1,221 g (10 mM) Tris-HCl, 10 ml (1%) Triton
X-100, 1,016 g (5 mM) MgCl₂ ad 1000 ml destilliertem Wasser (pH
7,5).

Die Kissenflüssigkeit des Kits besteht vorzugsweise aus 10 ml
1,5 M NaCl-Lösung (87,6 g NaCl auf 1000 ml), 49,2 ml Percoll mit
einer Dichte von 1,13 ± 0,005 g/ml, 40,8 ml destilliertem Wasser
(je 100 ml Kissenflüssigkeit).

Die Kits zur Durchführung des Verfahrens zur Isolierung und/oder
Anreicherung bakterieller DNA kann gegebenenfalls weitere Be-
standteile enthalten, die zur (weiteren) Probenaufbereitung
benötigt werden oder zweckmäßig sind. So enthalten die Kits
zusätzlich Bestandteile zum Aufschluß der Bakterien und gegeb-
enenfalls zur DNA-Reinigung (insbesondere zur Elimination von
Inhibitoren der Amplifikation) oder dergleichen, wie z.B. Be-
standteile von auf Glasmatrix basierenden kommerziellen Aufrei-
nigungs-Systemen (z.H. QIAamp DNA Kit). Bevorzugt enthält ein
solcher Kit ferner Proteinase K zum Aufschluß der Bakterien.

Ein Kit zur Durchführung des Verfahrens zum speziesspezifischen
Nachweis von Prokaryonten oder Eukaryonten aus biologischen Pro-
ben oder Umweltproben enthält - gegebenenfalls zusätzlich zu den

Bestandteilen eines oben genannten Kits zur Durchführung des DNA-Aufarbeitungs- bzw. Anreicherungsverfahrens - folgende Bestandteile:

- 5 a) Gefäße und Bestandteile zur Durchführung einer NAT, einschließlich der Amplifikationsprimer, wobei die Amplifikationsprimer Sequenzen enthalten, die bei den betreffenden, nachzuweisenden Prokaryonten oder Eukaryonten konserviert sind,
- 10 b) Gefäße und Bestandteile zur Durchführung einer oder mehrerer Kettenabbruchpolymerisationen, einschließlich ein oder mehrere (ggf. markierte bzw. unterschiedlich markierte) Sequenzierprimer (vorzugsweise mit einer
- 15 Länge von 15 bis 30 Nukleotiden), der/die mit einem Bereich innerhalb der zu amplifizierenden Sequenzen hybridisiert/hybridisieren, der bei den nachzuweisenden Prokaryonten oder Eukaryonten konserviert ist.
- 20 Der Kit enthält zur Durchführung der Kettenabbruchpolymerisationen entweder 1, 2, oder 3 der vier möglichen Desoxyribonukleosidtriphosphate (dNTPs) oder alle vier möglichen dNTPs, wobei ein dNTP durch ein Kettenabbruch-Desoxyribonukleosidtriphosphat (wie z.B. ein ddNTP, 3'-O-Methyl-NTP, 3'-Amino-NTP oder
- 25 dergleichen) ersetzt ist.

Der Kit umfaßt gegebenenfalls ferner Bestandteile zur Bestimmung der Elongatlänge (z.B. zur Durchführung einer Elektrophorese) bzw. entsprechende Bestandteile, die erforderlich oder nützlich

30 sind, um die Proben für entsprechende Verfahren, mit denen die Elongatlänge ermittelt werden kann, vorzubereiten. Solche Bestandteile ergeben sich für den Fachmann aus der obigen Beschreibung des Verfahrens zum speziesspezifischen Nachweis von Prokaryonten oder Eukaryonten, auf die in diesem Zusammenhang

35 ausdrücklich Bezug genommen wird.

Gemäß einer besonderen Ausführungsform der Erfindung handelt es sich bei dem Kit z.B. um einen Kit zum Nachweis von Prokaryonten, insbesondere von Sepsiserregern, der als Amplifikationsprimer zwei hoch-konservierte Sequenzen aus der rRNA-Region, vorzugsweise die Amplifikationsprimer gemäß SEQ ID NO 1 und 2 oder gemäß SEQ ID NO 3 und 4 (wobei das Primerpaar gemäß SEQ ID NO 1 und 2 besonders bevorzugt ist), und/oder mindestens einen Sequenzierungsprimer, der mit einem konservierten Bereich der rRNA-Region hybridisiert, vorzugsweise mindestens einen Sequenzierungsprimer aus der Gruppe bestehend aus SEQ ID NO 5, 6, 7, 8, 9, 10 und 11 (wobei Mischungen bzw. Gemische der Sequenzierungsprimer gemäß SEQ ID NO 5 und 6, 7 bis 9 sowie 10 und 11 in einem einzigen oder getrennten Behältern besonders bevorzugt sind) enthält.

15

Die vorliegende Erfindung wird nachfolgend anhand von Beispielen näher erläutert.

20

Beispiel 1

Verfahren zur Anreicherung von Mikroorganismen in biologischen Proben:

25

Im vorliegenden Beispiel wurden Bakterien aus Blut aufbereitet bzw. angereichert. Dazu wurde Blut zunächst in Lysispuffer aufgenommen, der aus 109,5 g (0,32 M) Sucrose, 1,221 g (10 mM) Tris-HCl, 10 ml (1%) Triton X-100, 1,016 g (5 mM) MgCl₂ ad 1000 ml destilliertem Wasser (pH 7,5) bestand, wobei ein Anteil Blut mit vier Anteilen Lysispuffer (also z.B. 3 ml Blut mit 12 ml Lysispuffer) vermischt und für 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert wurde.

35 Anschließend wurde das Blut-Lysispuffer-Gemisch auf ein Kissen (5 ml) gegeben und die gesamte Lösung bei 1500 g für 30 Minuten

bei Raumtemperatur (RT) zentrifugiert. 100 ml der Kissenflüssigkeit setzten sich wie folgt zusammen: 10 ml (1,5 M) NaCl-Lösung (87,6 g NaCl auf 1000 ml), 49,2 ml Percoll mit einer Dichte von 1,13 g/ml (+/- 0.005 g/ml), 40,8 ml destilliertes Wasser. Statt
5 Percoll kann auch Sucrose oder Ficoll eingesetzt werden. Die Dichte des Kissens sollte in jedem Fall bei 1,07 g/ml liegen.

Das Pellet, in dem sich die Bakterien befanden, wurde zweimal bei RT mit 0,15 M NaCl gewaschen und bei 1500 g pelletiert.

10

Anschließend erfolgte Proteinase K-Verdau des in TE-Puffer (10 mM Tris-HCl (pH 8), 1 mM Na₂EDTA) resuspendierten Bakterienpellets bei 56°C für zwei Stunden, und die Proteinase K wurde im Anschluß bei 95°C für 15 Minuten inaktiviert. Das erhaltene
15 Lysat wurde dann in der Amplifikation eingesetzt. Alternativ können auch auf Glasmatrix basierende kommerzielle Aufreinigungs-Systeme (z.H. QIAamp DNA Kit) zum Aufschluß der Bakterien und zur Elimination von Inhibitoren der Amplifikation eingesetzt werden.

20

Beispiel 2

Nachweis von Mikroorganismen durch PCR-gestützte Amplifikation und anschließende Elongation der Amplifikate:

25

Die in Beispiel 1 erhaltene bakterielle DNA wurde einer PCR-Amplifikation unterzogen, und die erhaltenen Amplifikate wurden anschließend in einer Kettenabbruchpolymerisation eingesetzt. Diese Methoden und die Bedingungen, unter denen diese Metho-
30 den durchgeführt werden, sind dem Fachmann wohlbekannt (vgl. z.B. Garcia-Pichel et al., Arch. Microbiol. 169 (1998) 469-482; Cha et al., PCR Methods and Application 3 (1993) S18-29 (Manual Supplement); Tracy et al., Bio Techniques 11 (1) (1991) 68-75).

35

A. Nukleinsäure-Amplifikation:

Mit Hilfe der PCR wurde die 16S rRNA-Region mit zwei hochkonservierten Primern amplifiziert. Dazu wurden ein 16S-5'terminaler
5 (SEQ ID NO 1) und ein 16S-3'terminaler Primer (SEQ ID NO 2) kombiniert, wobei einer der beiden PCR-Primer (hier der 16S-5'terminale Primer) ein zur Immobilisierung geeignetes Derivat, z.B. Biotin, enthielt.

- 10 Anstelle der 16S rRNA kann auch der 16S-23S-rRNA-Spacer amplifiziert werden, gegebenenfalls mit den Primern gemäß SEQ ID NO 3 (16S-proximaler Primer) und SEQ ID NO 4 (23S-proximaler Primer).

Es ist für den Fachmann selbstverständlich, daß durch Modifikation der Oligonukleotide (wobbles, Mismatches, Biotin-, Digoxigenin- oder Fluoresceinmarkierung etc.), das Ergebnis der PCR
15 nicht grundlegend beeinflusst wird.

Die amplifizierten rRNA-Bereiche wurden nachfolgend einer Elongation unterzogen.
20

B. Elongation der Amplifikate

Zur Elongation der amplifizierten Spacer-Sequenzen wurden Oligonukleotide als Sequenzierungsprimer eingesetzt, die universell
25 konserviert sind oder zumindest bei allen Zielorganismen innerhalb der zu erfassenden Gruppe vorhanden sind. Nach Elongation mit einer Polymerase - unter Weglassung eines der vier natürlichen Nukleosidtriphosphate oder in Anwesenheit eines Terminator-
30 Nukleosidtriphosphats (z.B. ddNTP) - entstanden Produkte mit unterschiedlicher, charakteristischer Länge.

Zur Elongation wurden vorliegend jeweils die folgenden Sequenzierungsprimer verwendet, die zu 16S rRNA-Sequenzen komplementär
35 sind, die bei allen Bakterien (Bacteria und Archaea) universell vorkommen (vgl. auch D.J. Lane, a.a.O.):

109r: SEQ ID NO 5 (109r1) und SEQ ID NO 6 (109r2)
685r: SEQ ID NO 7 (685r1), SEQ ID NO 8 (685r2),
SEQ ID NO 9 (685r3).

- 5 Zur Elongation wurden ferner zwei unterschiedlich markierte Sequenzierungsprimer 1475r^s (SEQ ID NO 10) und 1475r^h (SEQ ID NO 11) verwendet.

- 10 1475r^s ist - innerhalb der Sepsis-Erreger - für die Gruppe der Gram-positiven Kokken spezifisch. 1475r^h ist - innerhalb der Sepsis-Erreger - für die Gruppe *Haemophilus* spezifisch.

- 15 Die entsprechenden 16S rRNA-Sequenzen wurden ausgewählt, da direkt benachbart sehr divergente Sequenzen vorhanden sind, d.h. Sequenzen, die für eine speziesspezifische Unterscheidung von Mikroorganismen (Bakterien) verwendet werden können.

- 20 Für Sequenzierungsprimer 109r wurden die Nukleosidtriphosphate dGTP, dCTP, dTTP entweder allein oder unter Zusatz von ddATP (wie in in der Tab. 1 angegeben) eingesetzt. Bei Verwendung von dGTP, dCTP und dTTP alleine sind die in Tab. 1 angegebenen Werte um eine Nukleotideinheit zu verringern.

- 25 Für Sequenzierungsprimer 685r wurden die Nukleosidtriphosphate dATP, dCTP, dTTP entweder allein, oder unter Zusatz von ddGTP (wie in in der Tab. 1 angegeben) eingesetzt. Bei Verwendung von dGTP, dCTP und dTTP alleine sind die in Tab. 1 angegebenen Werte um eine Nukleotideinheit zu verringern.

- 30 Für Sequenzierungsprimer 1475r wurden die Nukleosidtriphosphate dGTP, dCTP, dTTP entweder allein oder unter Zusatz von ddATP (wie in in der Tab. 1 angegeben) eingesetzt. Bei Verwendung von dGTP, dCTP und dTTP alleine sind die in Tab. 1 angegebenen Werte um eine Nukleotideinheit zu verringern.

35

Die Elongationsreaktionen wurden unter dem Fachmann allgemein

bekannten Bedingungen durchgeführt (vgl. z.B. Fu et al., a.a.O.).

Die mit den oben genannten Primern erhaltenen Oligonukleotid-
5 Elongate sind nachfolgend in Tab. 1 angegeben.

Im vorliegenden Beispiel wurden die Elongate durch Fluoreszenz-
detektion oder Massenspektrometrie nachgewiesen. Es war eine
eindeutige Differenzierung zwischen *Pseudomonas aeruginosa*
10 (Elongate von 10 und 4 Basen) und *Haemophilus influenzae* (Elongate von 6 und 3 Basen) möglich (s. Tab. 1).

Der zunächst unter Verwendung der Primer 109r und 685r gemäß
Beispiel 2 erhaltene Datensatz ermöglichte keine Unterscheidung
15 zwischen *Staphylococcus aureus* und *Staphylococcus epidermidis*.
Diese ist jedoch unverzichtbar und wurde durch den zusätzlichen
Einsatz des gruppenspezifischen Primers 1475r^s erreicht. Ebenso
war eine Unterscheidung der beiden *Haemophilus* Species durch
Verwendung des Primers 1475r^h möglich (vgl. Tab. 1).

20

Die in Tab. 1 dargestellten Ergebnisse zeigen, daß bei Verwen-
dung der Sequenz-spezifischen Primer charakteristische Elongate
erhalten werden, die eine Differenzierung unterschiedlicher
Erreger gestatten.

25

Mit den in Tab. 1 aufgeführten Spezies sind ca. 80 % aller typi-
scher Sepsis-Fälle erfaßt (Geerdes-Fenge et al. (1994) Chemot-
her. J. 3, 131-143). Ein Nachweis der Sepsis ist somit unter
Verwendung von nur drei Sequenz-spezifischen Primern, vorzugs-
30 weise 109r, 685r und 1475r, möglich.

Tab. 1: Sequenz-spezifische Oligonukleotid-Elongate innerhalb von 16S rRNA-Regionen

Spezies	Primer 109r ^{a)} , ddA-Terminator Länge des Elongats (Basen)	Primer 685r ^{b)} , ddG-Terminator Länge des Elongats (Basen)	Primer 1475r ^{c)} , ddA-Terminator Länge des Elongats (Basen)
Gram-positive Kokken			
<i>Staphylococcus aureus</i>	9	5	6 ^s
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	9	5	5 ^s
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	5	5	7 ^s
<i>Streptococcus pyogenes</i>	7	5	62 ^s
<i>Enterococcus faecalis</i>	8	2	
Gram-negative Kokken			
<i>Neisseria meningitidis</i>	1	2	
Enterobakterien: Gram-negative Stäbchen			
<i>Escherichia coli</i>	6	5	
<i>Enterobacter spec.</i>	13	5	
<i>Proteus spec.</i>	13	3	
Gram-negative begeißelte Pseudomonaden			
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	10	4	
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	12	19	
<i>Pseudomonas mendocina</i>	9	4	
<i>Pseudomonas syringae</i>	13	4	
Pasteurellaceae: Gram-negative unbegeißelte Stäbchen			
<i>Haemophilus influenzae</i>	6	3	5 ^h
<i>Haemophilus ducreyi</i>	6	3	7 ^h
Obligat anaerobe Gram-negative Stäbchen			
<i>Bacteroides spec.</i>	13(14) ^{**}	6	

^{a)}Mischung aus 109r1 und 109r2, ^{b)} Mischung aus 685r1, 685r2 und 685r3, ^{c)} Mischung aus 1475r^s und 1475r^h
(14)^{**}: Nur ein Isolat in dieser relativ heterogenen Gattung ergibt diese Elongatlänge.

Patentansprüche:

1. Verfahren zum spezies-spezifischen Nachweis von Prokaryonten oder Eukaryonten mit Hilfe von Nukleinsäure-Amplifikations-techniken, dadurch gekennzeichnet, daß man folgende Schritte durchführt:

- a) Amplifikation der DNA aus biologischen Proben mit Hilfe einer Nukleinsäure-Amplifikationstechnik,

wobei man einen Bereich der DNA amplifiziert, der durch konservierte Sequenzen begrenzt ist, unter Verwendung von Amplifikationsprimern, die die konservierten Sequenzen enthalten,

- b) Zugabe eines Sequenzierprimers zu den Amplifikaten, der mit einem Bereich innerhalb der amplifizierten Sequenzen hybridisiert, der bei den nachzuweisenden Prokaryonten oder Eukaryonten konserviert ist, wobei der Sequenzierprimer so gewählt ist, daß für die nachzuweisenden Prokaryonten oder Eukaryonten jeweils unterschiedliche Elongate erhalten werden, wenn man eine Kettenabbruchpolymerisation durchführt, bei der man 1, 2, oder 3 der vier möglichen dNTPs verwendet oder von den vier möglichen dNTPs eines durch ein Kettenabbruch-NTP ersetzt,

- c) Bestimmung der Länge der erhaltenen Elongate,

wobei man die Prokaryonten oder Eukaryonten dadurch nachweist, daß die erhaltenen Elongate mit den für die jeweiligen Prokaryonten oder Eukaryonten aufgrund ihrer Sequenz zu erwartenden Elongate übereinstimmen,

- d) wobei man gegebenenfalls einen oder mehrere weitere Sequenzierprimer verwendet, der/die mit einem Bereich/Bereichen innerhalb der amplifizierten Sequenzen hybridisiert,

sert/hybridisieren, der/die bei den nachzuweisenden Prokaryonten oder Eukaryonten konserviert ist/konserviert sind,

wobei der/die weitere/weiteren Sequenzierprimer so gewählt ist/sind, daß für die nachzuweisenden Prokaryonten oder Eukaryonten jeweils unterschiedliche Elongate erhalten werden, wenn man eine Kettenabbruchpolymerisation durchführt, bei der man 1, 2, oder 3 der vier möglichen dNTPs verwendet oder von den vier möglichen dNTPs eines durch ein Kettenabbruch-NTP ersetzt,

und wobei durch Verwendung des/der weiteren Sequenzierprimers/Sequenzierprimer für die jeweils nachzuweisenden Prokaryonten oder Eukaryonten jeweils unterschiedliche Elongatmuster erhalten werden,

e) Bestimmung der Länge der erhaltenen Elongate,

wobei man die Prokaryonten oder Eukaryonten dadurch nachweist, daß die bei Verwendung mehrerer Sequenzierprimer erhaltenen Elongatmuster mit den für die jeweiligen Prokaryonten oder Eukaryonten aufgrund ihrer Sequenz zu erwartenden Elongatmustern übereinstimmen.

2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß man vor der Amplifikation eine Anreicherung, Aufkonzentrierung und/oder Vermehrung der nachzuweisenden Prokaryonten oder Eukaryonten und/oder eine Isolierung und/oder Anreicherung der DNA vornimmt.
3. Verfahren nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, daß Nukleinsäure-Amplifikationstechnik aus der Gruppe bestehend aus PCR, bDNA, LCR, 3SR, SDA oder NASBA ausgewählt ist.

4. Verfahren nach den Ansprüchen 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, daß man mehrere Sequenzierprimer verwendet und man bei der Kettenabbruchreaktion von den vier möglichen dNTPs eines durch ein Kettenabbruch-NTP ersetzt, wobei man die Polymerisation in Gegenwart aller Sequenzierprimer durchführt, wobei die Sequenzierprimer jeweils unterschiedliche Markierungen tragen.
5. Verfahren nach den Ansprüchen 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, daß der/die Sequenzierprimer eine Länge von 15 bis 30 Nukleotiden aufweist/aufweisen.
6. Verfahren nach den Ansprüchen 1 bis 5, dadurch gekennzeichnet, daß das Kettenabbruch-NTP Didesoxyribonukleosidtriphosphat (ddNTP), 3'-O-Methyl-NTP oder 3'-Amino-NTP ist.
7. Verfahren nach den Ansprüchen 1 bis 6, dadurch gekennzeichnet, daß man die Länge der Elongate mit Hilfe elektrophoretischer Methoden, durch massenspektrometrischen Nachweis oder durch Fluoreszenzkorrelationsspektroskopie bestimmt.
8. Verfahren nach Anspruch 7, dadurch gekennzeichnet, daß die Länge der Elongate durch Matrix-assisted laser desorption ionization time of flight spectrometry (MALDI-TOF-Spektrometrie) bestimmt.
9. Verfahren nach den Ansprüchen 1 bis 8, dadurch gekennzeichnet, daß der amplifizierte DNA-Bereich rDNA ist.
10. Verfahren nach Anspruch 9, dadurch gekennzeichnet, daß der DNA-Bereich die rRNA-Spacerregion ist.
11. Verfahren nach den Ansprüchen 1 bis 9, dadurch gekennzeichnet, daß man als Amplifikationsprimer das Primerpaar gemäß SEQ ID NO 1 und 2 oder das Primerpaar gemäß SEQ ID NO 3 und 4 verwendet.

12. Verfahren nach den Ansprüchen 1 bis 11, dadurch gekennzeichnet, daß man mindestens eine Kettenabbruchpolymerisation durchführt und den/die Sequenzierungsprimer aus der Gruppe bestehend aus Sequenzierungsprimern gemäß SEQ ID NO 5, 6, 7, 8, 9, 10 und 11 auswählt.
13. Verfahren nach den Ansprüchen 1 bis 8, dadurch gekennzeichnet, daß es ein Verfahren zum spezies-spezifischen Nachweis von Eukaryonten ist und der amplifizierte DNA-Bereich das Cytochrom b-Gen aus Mitochondrien ist.
14. Verfahren nach den Ansprüchen 1 bis 12, dadurch gekennzeichnet, daß es ein Verfahren zum Nachweis von Sepsiserregern ist, bei dem die biologische Probe Blut ist und die Organismen aus der Gruppe bestehend aus *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus pyogenes*, *Enterococcus faecalis*, *Neisseria meningitidis*, *Escherichia coli*, *Enterobacter spec.*, *Proteus spec.*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas mendocina*, *Pseudomonas syringae*, *Haemophilus influenzae*, *Haemophilus ducreyi* und *Bacteroides spec.* ausgewählt sind.
15. Verfahren nach Anspruch 14, dadurch gekennzeichnet, daß man Blut in einer geeigneten Menge Lysispuffer durch Vermischen von 1 Volumenanteil Blut mit 4 Volumenanteilen Lysispuffer aufnimmt, wobei der Lysispuffer aus 109,5 g (0,32 M) Sucrose, 1,221 g (10 mM) Tris-HCl, 10 ml (1%) Triton X-100, 1,016 g (5 mM) MgCl₂ ad 1000 ml destilliertem Wasser (pH 7,5) besteht, man anschließend für 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend das Gemisch in einem Zentrifugenröhrchen einer geeigneten Menge einer Kissenflüssigkeit überschichtet, wobei 100 ml der Kissenflüssigkeit aus 10 ml (1,5 M) NaCl-Lösung (87,6 g NaCl auf 1000 ml), 49,2 ml Percoll mit einer Dichte von 1,13 ± 0,005 g/ml, 40,8 ml destillierte Wasser bestehen, und man bei 1500 g für 30 Minuten bei Raumtemperatur zentrifugiert, man das Pellet zweimal mit

0,15 M NaCl-Lösung bei Raumtemperatur wäscht, man bei 1500 g pelletiert und man das in TE-Puffer resuspendierte Bakterienpellet nachfolgend für 2 Stunden bei 56°C mit Proteinase K verdaut und man die Proteinase K im Anschluß bei 95°C für 15 Minuten inaktiviert, wobei man das erhaltene Lysat entweder unmittelbar in einer Nukleinsäure-Amplifikationstechnik einsetzt oder man zuvor einer weiteren Aufreinigung durch Verwendung eines auf Glasmatrix basierenden Aufreinigungssystems zum Aufschluß von Bakterien und/oder Elimination von Inhibitoren der Amplifikation durchführt.

16. Verfahren nach den Ansprüchen 1 bis 10, dadurch gekennzeichnet, daß es ein Verfahren zum Nachweis von Protozoen ist, bei dem die biologische Probe Blut ist und die Eukaryonten aus der Gruppe bestehend aus der Gruppe bestehend aus Flagellaten, Amöben, Sporozoa und Ciliaten ausgewählt sind.
17. Verfahren nach den Ansprüchen 1 bis 11, dadurch gekennzeichnet, daß es ein Verfahren zum Nachweis von Salmonellen ist, bei dem die biologische Probe Fleisch oder Fleischsaft ist und die Prokaryonten Salmonellen sind.
18. Verfahren nach den Ansprüchen 1 bis 10, dadurch gekennzeichnet, daß die biologische Probe Fischlaich ist und die Eukaryonten Fische sind.
19. Verwendung eines Verfahrens nach den Ansprüchen 1 bis 15 in der medizinischen Diagnostik.
20. Verfahren zur Aufbereitung und/oder Aufkonzentrierung von Bakterien, dadurch gekennzeichnet, daß man eine biologische Probe gegebenenfalls in Puffer aufnimmt und vorhandene nicht-bakterielle Zellen unter Verwendung von 1 bis 20 Gew.-% Tween[®] (Polyoxyethylen-Derivate von Sorbitanestern), Triton[®] oder 3-[N-(3-Cholanamidopropyl)-dimethylammonio]-1-propansulfonat (CHAPS) und Inkubation für 5 Minuten bei

Raumtemperatur einer Lyse unterzieht, das Gemisch anschließend in einem Zentrifugenröhrchen einer geeigneten Menge einer Kissenflüssigkeit einer Dichte von 1,07 g/ml überschichtet und man bei 1500 g für 30 Minuten bei Raumtemperatur zentrifugiert, wodurch man die Bakterien im Pellet erhält und/oder anreichert.

21. Verfahren nach Anspruch 20, dadurch gekennzeichnet, daß man das erhaltene Pellet ferner zweimal mit 0,15 M NaCl-Lösung bei Raumtemperatur wäscht und bei 1500 g pelletiert.
22. Verfahren nach Anspruch 20 oder 21, dadurch gekennzeichnet, daß man eine Kissenflüssigkeit verwendet, von der 100 ml aus 10 ml (1,5 M) NaCl-Lösung (87,6 g NaCl auf 1000 ml), 49,2 ml Percoll mit einer Dichte von $1,13 \pm 0,005$ g/ml und 40,8 ml destilliertem Wasser bestehen.
23. Verfahren zur Isolierung und/oder Anreicherung bakterieller DNA, dadurch gekennzeichnet, daß man ein Verfahren nach einem der Ansprüche 20 bis 22 durchführt und man die Bakterien im Pellet anschließend einer Lyse unterzieht.
24. Verfahren nach Anspruch 23, dadurch gekennzeichnet, daß man die Lyse durchführt, indem man das Bakterienpellet in TE-Puffer resuspendierte und für 2 Stunden bei 56°C mit Proteinase K verdaut und man die Proteinase K im Anschluß bei 95°C für 15 Minuten inaktiviert, wodurch man ein Lysat erhält, in dem die bakterielle DNA enthalten ist.
25. Verfahren zum spezies-spezifischen Nachweis von Prokaryonten oder Eukaryonten mit Hilfe von Nukleinsäure-Amplifikations-techniken, dadurch gekennzeichnet, daß man zunächst ein Verfahren nach den Ansprüchen 20 bis 24 und anschließend ein Verfahren nach den Ansprüchen 1 bis 14 durchführt.

26. Kit zur Durchführung eines Verfahrens nach den Ansprüchen 20 bis 22, dadurch gekennzeichnet, daß es

a) Lysispuffer enthaltend 1 bis 20 Gew.-% Tween[®] (Polyoxyethylen-Derivate von Sorbitanestern), Triton[®] oder 3-[N-(3-Cholanamidopropyl)-dimethylammonio]-1-propansulfonat (CHAPS),

b) Zentrifugenröhrchen, und

c) Kissenflüssigkeit einer Dichte von 1,07 g/ml

enthält.

27. Kit nach Anspruch 26, dadurch gekennzeichnet, daß der Lysispuffer aus 109,5 g (0,32 M) Sucrose, 1,221 g (10 mM) Tris-HCl, 10 ml (1%) Triton X-100, 1,016 g (5 mM) MgCl₂ ad 1000 ml destilliertem Wasser (pH 7,5) besteht.

28. Kit nach Anspruch 20 oder 27, dadurch gekennzeichnet, daß die Kissenflüssigkeit aus 10 ml (1,5 M) NaCl-Lösung (87,6 g NaCl auf 1000 ml), 49,2 ml Percoll mit einer Dichte von 1,13 ± 0,005 g/ml, 40,8 ml destilliertem Wasser (je 100 ml Kissenflüssigkeit) besteht.

29. Kits zur Durchführung eines Verfahrens nach Anspruch 23 oder 24, dadurch gekennzeichnet, daß es zusätzlich zu den Bestandteilen eines Kits nach den Ansprüchen 26 bis 28 Bestandteile zum Aufschluß der Bakterien und zur DNA-Reinigung enthält.

30. Kit nach Anspruch 29, dadurch gekennzeichnet, daß es Proteinase K enthält.

31. Kit zur Durchführung eines Verfahrens nach den Ansprüchen 1 bis 18, dadurch gekennzeichnet, daß es

- a) Gefäße und Bestandteile zur Durchführung einer NAT, einschließlich der Amplifikationsprimer, wobei die Amplifikationsprimer Sequenzen enthalten, die bei den betreffenden, nachzuweisenden Prokaryonten oder Eukaryonten konserviert sind,
 - b) Gefäße und Bestandteile zur Durchführung einer oder mehrerer Kettenabbruchpolymerisationen, einschließlich ein oder mehrere (ggf. markierte bzw. unterschiedlich markierte) Sequenzierprimer (vorzugsweise mit einer Länge von 15 bis 30 Nukleotiden), der/die mit einem Bereich innerhalb der zu amplifizierenden Sequenzen hybridisiert/-hybridisieren, der bei den nachzuweisenden Prokaryonten oder Eukaryonten konserviert ist, und
 - c) Bestandteile zur Bestimmung der Elongatlänge
- enthält.

32. Kit nach Anspruch 31, dadurch gekennzeichnet, daß er zur Durchführung der Kettenabbruchpolymerisationen entweder 1, 2, oder 3 der vier möglichen Desoxyribonukleosidtriphosphate (dNTPs) oder alle vier möglichen dNTPs enthält, wobei eines dieser dNTPs durch ein Kettenabbruch-Desoxyribonukleosidtriphosphat ersetzt ist.

33. Kit nach Anspruch 32, dadurch gekennzeichnet, daß das Kettenabbruch-Desoxyribonukleosidtriphosphat ein ddNTP, 3'-O-Methyl-NTP oder 3'-Amino-NTP ist.

34. Kit nach den Ansprüchen 31 bis 33, dadurch gekennzeichnet, daß die Bestandteile zur Bestimmung der Elongatlänge Vorrichtungen und Mittel zur Durchführung einer elektrophoretischen Methode, einer massenspektrometrischen Methode oder einer Fluoreszenzkorrelationsspektroskopie umfassen.
35. Kit den Ansprüchen 31 bis 34, dadurch gekennzeichnet, daß er zusätzlich die Bestandteile eines Kits den Ansprüchen 25 bis 29 enthält.
36. Kit nach den Ansprüchen 31 bis 35, dadurch gekennzeichnet, daß es ein Kit zum Nachweis von Prokaryonten ist, der als Amplifikationsprimer zwei hoch-konservierte Sequenzen aus der rRNA-Region enthält.
37. Kit nach Anspruch 36, dadurch gekennzeichnet, daß daß die Amplifikationsprimer die Primer gemäß SEQ ID NO 1 und 2 oder die Primer gemäß SEQ ID NO 3 und 4 sind.
38. Kit nach den Ansprüchen 36 und 37, dadurch gekennzeichnet, daß er mindestens einen Sequenzierungsprimer enthält, der mit einem konservierten Bereich der rRNA-Region hybridisiert.
39. Kit nach Anspruch 38, dadurch gekennzeichnet, daß der/die Sequenzierungsprimer aus der Gruppe bestehend aus Sequenzierungsprimern gemäß SEQ ID NO 5, 6, 7, 8, 9, 10 und 11 ausgewählt ist/sind.
40. Kit nach Anspruch 39, dadurch gekennzeichnet, daß er eine Mischung der Sequenzierungsprimer gemäß SEQ ID NO 5 und 6, eine Mischung der Sequenzierungsprimer gemäß SEQ ID NO 7 bis 9 sowie eine Mischung der Sequenzierungsprimer gemäß SEQ ID NO 10 und 11 in einem einzigen oder getrennten Behältern enthält.

41. Kit nach den Ansprüchen 31 bis 40, dadurch gekennzeichnet, daß es ein Kit zum Nachweis von Sepsiserregern ist.

SEQUENZPROTOKOLL

- <110> Krupp Dr., Guido
Scheinert, Peter
Söller Dr., Rainer
Spengler Dr., Ulrich
Artus Gesellschaft für molekularbiologische
Diagnostik und Entwicklung mbH
- <120> Nachweisverfahren für Organismen
- <130> P050133
- <140>
<141>
- <160> 11
- <170> PatentIn Vers. 2.0
- <210> 1
<211> 20
<212> DNA
<213> Künstliche Sequenz
- <220>
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:
16S-5'terminaler Primer
- <400> 1
agagtttgat cmtggctcag
20
- <210> 2
<211> 22
<212> DNA
<213> Künstliche Sequenz
- <220>
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:
16S-3'terminaler Primer
- <400> 2
tacggytacc ttggttacgac tt
22
- <210> 3
<211> 18
<212> DNA
<213> Künstliche Sequenz
- <220>
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: 16S-proximaler
Primer

- 2 -

<400> 3
aagtcgtaac aaggtaac
18

<210> 4
<211> 15
<212> DNA
<213> Künstliche Sequenz

<220>
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: 23S-proximaler
Primer

<400> 4
ggttbccccca ttcrg
15

<210> 5
<211> 17
<212> DNA
<213> Künstliche Sequenz

<220>
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:
Sequenzierprimer 109r1

<400> 5
acgygttack caccgt
17

<210> 6
<211> 17
<212> DNA
<213> Künstliche Sequenz

<220>
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:
Sequenzierprimer 109r2

<400> 6
akrcattact caccgt
17

<210> 7
<211> 20
<212> DNA
<213> Künstliche Sequenz

<220>
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:
Sequenzierprimer 685r1

<400> 7
tctacgratt tcaccyctac

20

<210> 8
<211> 20
<212> DNA
<213> Künstliche Sequenz

<220>
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:
Sequenzierprimer 685r2

<400> 8
tctacgcatt tcacygctac
20

<210> 9
<211> 20
<212> DNA
<213> Künstliche Sequenz

<220>
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:
Sequenzierprimer 685r3

<400> 9
tctrcgcatt ycaccgctac
20

<210> 10
<211> 18
<212> DNA
<213> Künstliche Sequenz

<220>
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:
Sequenzierprimer 1475rs

<400> 10
cccaccttcg acggctag
18

<210> 11
<211> 18
<212> DNA
<213> Künstliche Sequenz

<220>
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:
Sequenzierprimer 1475rh

<400> 11
cataccgtgg taaacgcc
18

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/EP 99/05234

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 7 C12Q1/68		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC 7 C12Q		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 98 20166 A (DEN BOOM DIRK VAN ; JURINKE CHRISTIAN (DE); HIGGINS G SCOTT (DE); L) 14 May 1998 (1998-05-14) page 1-17	1-9, 12, 13, 15-18
Y	page 73-75; figure 65; example 15 ---	10, 11
X	"Nucleic acid techniques in bacterial systematics" 1991, JOHN WILEY AND SONS XP000905166 cited in the application	30-38, 40
Y	Lane D.: "16S/23S rRNA sequencing" pages 115-175 the whole document --- -/-	10, 11
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C. <input checked="" type="checkbox"/> Patent family members are listed in annex.		
* Special categories of cited documents:		
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance		
"E" earlier document but published on or after the international filing date		
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)		
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means		
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed		
"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention		
"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone		
"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.		
"&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 20 April 2000		Date of mailing of the international search report 09/05/2000
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl. Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer Reuter, U

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 1992)

page 1 of 2

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/EP 99/05234

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 96 19585 A (HEIDELBERG REPATRIATION HOSPIT :GUERTLER VOLKER (AU)) 27 June 1996 (1996-06-27) cited in the application	30-35, 37.40
Y	the whole document	1-9.12, 13.15-18
Y	--- WO 96 30545 A (APPLIED GENETICS INC) 3 October 1996 (1996-10-03) the whole document	1-9.12, 13.15-18
X	--- WO 97 41259 A (LACROIX JEAN MICHEL ;HUI MAY (CA); DUNN JAMES M (CA); LEUSHNER JAM) 6 November 1997 (1997-11-06) the whole document	30-34,40
A	--- EP 0 096 674 A (LKB PRODUKTER AB :NILSSON LENNART (SE); MOLIN ORJAN (SE)) 21 December 1983 (1983-12-21) the whole document	19-29
A	--- EP 0 745 849 A (BECTON DICKINSON CO) 4 December 1996 (1996-12-04) the whole document	19-29
A	--- WO 93 23568 A (HOLMES ANN RACHEL ;CANNON RICHARD DAVID (NZ); JENKINSON HOWARD FRA) 25 November 1993 (1993-11-25) page 24-26	19-29
A	--- US 5 885 775 A (HAFF LAWRENCE A ET AL) 23 March 1999 (1999-03-23) the whole document	1-40
A	--- EP 0 480 289 A (BOEHRINGER MANNHEIM GMBH) 15 April 1992 (1992-04-15) the whole document	1-40
A	--- DE 196 29 166 A (ZTB ZENTRUM TECHNOLOGIETRANSFE) 27 February 1997 (1997-02-27) the whole document	12
E	--- DE 198 01 661 A (ARTUS GES FUER MOLEKULARBIOLOG) 22 July 1999 (1999-07-22) the whole document	1-9, 11-35, 37,38,40

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/EP 99/05234

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9820166 A	14-05-1998	US 5900481 A	04-05-1999
		US 6024925 A	15-02-2000
		AU 5106998 A	29-05-1998
		DE 19782095 T	23-03-2000
		EP 0954612 A	10-11-1999
		NO 992168 A	06-07-1999
		AU 5247298 A	29-05-1998
		DE 19782097 T	14-10-1999
		EP 0937097 A	25-08-1999
		NO 992167 A	05-07-1999
		WO 9820019 A	14-05-1998
		AU 5198098 A	29-05-1998
		DE 19782096 T	23-03-2000
		EP 0937096 A	25-08-1999
		NO 992169 A	06-07-1999
		WO 9820020 A	14-05-1998
WO 9619585 A	27-06-1996	AU 1307595 A	10-07-1996
WO 9630545 A	03-10-1996	AU 5296496 A	16-10-1996
		US 5976798 A	02-11-1999
WO 9741259 A	06-11-1997	US 5789168 A	04-08-1998
		US 5888736 A	30-03-1999
		US 5830657 A	03-11-1998
		AU 2378097 A	19-11-1997
		AU 2747597 A	19-11-1997
		AU 2816797 A	19-11-1997
		AU 2816897 A	19-11-1997
		CA 2252487 A	06-11-1997
		CA 2252571 A	06-11-1997
		CA 2252588 A	06-11-1997
		WO 9740939 A	06-11-1997
		EP 0896632 A	17-02-1999
		EP 0907752 A	14-04-1999
		EP 0914468 A	12-05-1999
		WO 9741257 A	06-11-1997
		WO 9741258 A	06-11-1997
		US 5897842 A	27-04-1999
EP 0096674 A	21-12-1983	SE 454278 B	18-04-1988
		DE 3362408 D	10-04-1986
		SE 8203564 A	10-12-1983
EP 0745849 A	04-12-1996	AU 4586096 A	19-09-1996
		CA 2170967 A	11-09-1996
WO 9323568 A	25-11-1993	AU 4094293 A	13-12-1993
		CA 2136206 A	25-11-1993
		EP 0642588 A	15-03-1995
US 5885775 A	23-03-1999	EP 0931166 A	28-07-1999
		WO 9814616 A	09-04-1998
EP 0480289 A	15-04-1992	DE 4038804 A	16-04-1992
		AT 150092 T	15-03-1997
		AT 122104 T	15-05-1995
		AU 655781 B	12-01-1995

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/EP 99/05234

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
EP 0480289 A		AU 8627591 A	28-04-1992
		CA 2052668 A	10-04-1992
		CA 2093647 A	10-04-1992
		DE 59105402 D	08-06-1995
		DE 59108610 D	17-04-1997
		DK 552203 T	02-10-1995
		WO 9206216 A	16-04-1992
		EP 0552203 A	28-07-1993
		ES 2101706 T	16-07-1997
		ES 2073771 T	16-08-1995
		FI 931586 A	07-04-1993
		IE 68525 B	26-06-1996
		IL 99663 A	31-12-1995
		JP 4258299 A	14-09-1992
		JP 6040839 B	01-06-1994
		JP 2673162 B	05-11-1997
		JP 6501157 T	10-02-1994
		NO 305995 B	30-08-1999
		NZ 240079 A	27-07-1993
		PT 99177 A,B	30-09-1992
		US 5753433 A	19-05-1998
		ZA 9108024 A	29-07-1992
DE 19629166 A	27-02-1997	NONE	
DE 19801661 A	22-07-1999	NONE	

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 99/05234

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES
IPK 7 C12Q1/68

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierte Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)
IPK 7 C12Q

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	WO 98 20166 A (DEN BOOM DIRK VAN ; JURINKE CHRISTIAN (DE); HIGGINS G SCOTT (DE); L) 14. Mai 1998 (1998-05-14) Seite 1-17	1-9, 12, 13, 15-18
Y	Seite 73-75; Abbildung 65; Beispiel 15	10, 11
X	"Nucleic acid techniques in bacterial systematics" 1991, JOHN WILEY AND SONS XP000905166 in der Anmeldung erwähnt	30-38, 40
Y	Lane D.: "16S/23S rRNA sequencing" pages 115-175 das ganze Dokument	10, 11

	---/---	



Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen



Siehe Anhang Patentfamilie

* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

"A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

"E" Älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

"L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

"O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

"P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

"T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

"X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderscher Tätigkeit beruhend betrachtet werden

"Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderscher Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

"Z" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

20. April 2000

Absenddatum des internationalen Recherchenberichts

09/05/2000

Name und Postanschrift der internationalen Recherchenbehörde
Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040. Tx. 31 651 epo nl.
Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Reuter, U

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	WO 96 19585 A (HEIDELBERG REPATRIATION HOSPIT ; GUERTLER VOLKER (AU)) 27. Juni 1996 (1996-06-27) in der Anmeldung erwähnt	30-35, 37,40
Y	das ganze Dokument	1-9,12, 13,15-18
Y	--- WO 96 30545 A (APPLIED GENETICS INC) 3. Oktober 1996 (1996-10-03) das ganze Dokument	1-9,12, 13,15-18
X	--- WO 97 41259 A (LACROIX JEAN MICHEL ; HUI MAY (CA); DUNN JAMES M (CA); LEUSHNER JAM) 6. November 1997 (1997-11-06) das ganze Dokument	30-34,40
A	--- EP 0 096 674 A (LKB PRODUKTER AB ; NILSSON LENNART (SE); MOLIN ORJAN (SE)) 21. Dezember 1983 (1983-12-21) das ganze Dokument	19-29
A	--- EP 0 745 849 A (BECTON DICKINSON CO) 4. Dezember 1996 (1996-12-04) das ganze Dokument	19-29
A	--- WO 93 23568 A (HOLMES ANN RACHEL ; CANNON RICHARD DAVID (NZ); JENKINSON HOWARD FRA) 25. November 1993 (1993-11-25) Seite 24-26	19-29
A	--- US 5 885 775 A (HAFF LAWRENCE A ET AL) 23. März 1999 (1999-03-23) das ganze Dokument	1-40
A	--- EP 0 480 289 A (BOEHRINGER MANNHEIM GMBH) 15. April 1992 (1992-04-15) das ganze Dokument	1-40
A	--- DE 196 29 166 A (ZTB ZENTRUM TECHNOLOGIETRANSFE) 27. Februar 1997 (1997-02-27) das ganze Dokument	12
E	--- DE 198 01 661 A (ARTUS GES FUER MOLEKULARBIOLOG) 22. Juli 1999 (1999-07-22) das ganze Dokument	1-9, 11-35, 37,38,40

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 99/05234

Im Recherchenbericht angeführtes Patentedokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
WO 9820166 A	14-05-1998	US 5900481 A	04-05-1999
		US 6024925 A	15-02-2000
		AU 5106998 A	29-05-1998
		DE 19782095 T	23-03-2000
		EP 0954612 A	10-11-1999
		NO 992168 A	06-07-1999
		AU 5247298 A	29-05-1998
		DE 19782097 T	14-10-1999
		EP 0937097 A	25-08-1999
		NO 992167 A	05-07-1999
		WO 9820019 A	14-05-1998
		AU 5198098 A	29-05-1998
		DE 19782096 T	23-03-2000
		EP 0937096 A	25-08-1999
		NO 992169 A	06-07-1999
		WO 9820020 A	14-05-1998
WO 9619585 A	27-06-1996	AU 1307595 A	10-07-1996
WO 9630545 A	03-10-1996	AU 5296496 A	16-10-1996
		US 5976798 A	02-11-1999
WO 9741259 A	06-11-1997	US 5789168 A	04-08-1998
		US 5888736 A	30-03-1999
		US 5830657 A	03-11-1998
		AU 2378097 A	19-11-1997
		AU 2747597 A	19-11-1997
		AU 2816797 A	19-11-1997
		AU 2816897 A	19-11-1997
		CA 2252487 A	06-11-1997
		CA 2252571 A	06-11-1997
		CA 2252588 A	06-11-1997
		WO 9740939 A	06-11-1997
		EP 0896632 A	17-02-1999
		EP 0907752 A	14-04-1999
		EP 0914468 A	12-05-1999
		WO 9741257 A	06-11-1997
		WO 9741258 A	06-11-1997
		US 5897842 A	27-04-1999
EP 0096674 A	21-12-1983	SE 454278 B	18-04-1988
		DE 3362408 D	10-04-1986
		SE 8203564 A	10-12-1983
EP 0745849 A	04-12-1996	AU 4586096 A	19-09-1996
		CA 2170967 A	11-09-1996
WO 9323568 A	25-11-1993	AU 4094293 A	13-12-1993
		CA 2136206 A	25-11-1993
		EP 0642588 A	15-03-1995
US 5885775 A	23-03-1999	EP 0931166 A	28-07-1999
		WO 9814616 A	09-04-1998
EP 0480289 A	15-04-1992	DE 4038804 A	16-04-1992
		AT 150092 T	15-03-1997
		AT 122104 T	15-05-1995
		AU 655781 B	12-01-1995

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 99/05234

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
EP 0480289 A		AU 8627591 A	28-04-1992
		CA 2052668 A	10-04-1992
		CA 2093647 A	10-04-1992
		DE 59105402 D	08-06-1995
		DE 59108610 D	17-04-1997
		DK 552203 T	02-10-1995
		WO 9206216 A	16-04-1992
		EP 0552203 A	28-07-1993
		ES 2101706 T	16-07-1997
		ES 2073771 T	16-08-1995
		FI 931586 A	07-04-1993
		IE 68525 B	26-06-1996
		IL 99663 A	31-12-1995
		JP 4258299 A	14-09-1992
		JP 6040839 B	01-06-1994
		JP 2673162 B	05-11-1997
		JP 6501157 T	10-02-1994
		NO 305995 B	30-08-1999
		NZ 240079 A	27-07-1993
		PT 99177 A, B	30-09-1992
		US 5753433 A	19-05-1998
		ZA 9108024 A	29-07-1992
DE 19629166 A	27-02-1997	KEINE	
DE 19801661 A	22-07-1999	KEINE	

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☒ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☒ FADED TEXT OR DRAWING
- ☒ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☒ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.

THIS PAGE BLANK (USPTO)